

Miguel Ângelo Rodrigues Oliveira

Fisiopatologia da disfunção diastólica: mecanismos e
implicações clínicas/ Pathophysiology of diastolic
dysfunction: mechanisms and clinical implications

5 de abril, 2017

Miguel Ângelo Rodrigues Oliveira
Fisiopatologia da disfunção diastólica: mecanismos
e implicações clínicas/ Pathophysiology of diastolic
dysfunction: mechanisms and clinical implications

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Fisiologia
Tipologia: Monografia

Trabalho efetuado sob a Orientação de:
Professor Doutor Joaquim Adelino Correia Ferreira Leite Moreira
E sob a Coorientação de:
Doutor Ricardo Manuel Alves Monteiro Fontes Carvalho

Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:
“Cardiopulmonar”

5 de abril, 2017

Eu, Miguel Ângelo Rodrigues Oliveira, abaixo assinado, nº mecanográfico 201100078, estudante do 6º ano do Ciclo de Estudos Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que **NÃO** incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 4/04/2017

Assinatura conforme cartão de identificação:

Miguel Ângelo Rodrigues Oliveira

NOME

Miguel Ângelo Rodrigues Oliveira

NÚMERO DE ESTUDANTE

201100078

E-MAIL

miguelaro10@gmail.com

DESIGNAÇÃO DA ÁREA DO PROJECTO

Fisiologia

TÍTULO DISSERTAÇÃO/MONOGRAFIA (riscar o que não interessa)

Fisiopatologia da disfunção diastólica: mecanismos e implicações clínicas

ORIENTADOR

Joaquim Adelino Correia Ferreira Leite Moreira

COORIENTADOR (se aplicável)

Ricardo Manuel Alves Monteiro Fontes Carvalho

ASSINALE APENAS UMA DAS OPÇÕES:

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTES TRABALHOS APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.	<input checked="" type="checkbox"/>
É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTES TRABALHOS (INDICAR, CASO TAL SEJA NECESSÁRIO, Nº MÁXIMO DE PÁGINAS, ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS, ETC.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.	<input type="checkbox"/>
DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (INDICAR, CASO TAL SEJA NECESSÁRIO, Nº MÁXIMO DE PÁGINAS, ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS, ETC.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTES TRABALHOS.	<input type="checkbox"/>

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 4/04/2017

Assinatura conforme cartão de identificação:

Miguel Ângelo Rodrigues Oliveira

DEDICATÓRIA

À minha família, por todo o carinho, dedicação, orientação e compreensão. Foram vocês que me permitiram completar esta jornada e nunca vos poderei agradecer o suficiente.

Um agradecimento também especial à turma, por tornarem os intervalos interessantes. Muito obrigado!

RESUMO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma entidade clínica altamente prevalente que afeta cerca de 1 a 2% na população adulta nos países desenvolvidos. Atualmente, a IC com fração de ejeção preservada (ICFEP) tem apresentado uma incidência crescente (correspondendo a cerca de 50% da IC) e uma taxa de mortalidade constante.

Assim, esta revisão visa sumariar os mecanismos conhecidos e a investigação que tem sido feita no sentido de os modular, sugerindo novas abordagens à DD potencialmente capazes de modificar o prognóstico da ICFEP.

Os mecanismos fisiopatológicos da DD têm sido objeto de ampla investigação. No entanto, os estudos realizados, nomeadamente ensaios clínicos, não encontraram terapêutica capaz de melhorar o prognóstico em doentes com ICFEP.

Palavras-chave: fisiopatologia, disfunção diastólica, mecanismos, ICFEP

INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma entidade clínica altamente prevalente que afeta cerca de 1 a 2% na população adulta nos países desenvolvidos, apresentando uma maior incidência em indivíduos com idade superior a 70 anos (1).

Esta constitui uma síndrome caracterizada por alterações estruturais e/ou funcionais cardíacas, que resultam na diminuição da fração de ejeção e/ou aumento das pressões intracardíacas. Desta forma, os principais sintomas são dispneia, cansaço e edema dos membros. Associado à gravidade da sintomatologia está a classificação de NYHA, que categoriza a IC em quatro graus de capacidade funcional, desde a classe I com doença cardíaca presente, mas sem limitações para atividades físicas, até à classe IV onde os sintomas podem estar presentes mesmo em repouso (1).

Para além disso, a classificação da IC pode ser baseada na fração de ejeção (FE) do ventrículo esquerdo (VE): IC com FE reduzida (ICFER), quando esta corresponde a menos de 40%; IC com FE intermédia, se entre 40 e 50%; e IC com FE preservada (ICFEP), se maior ou igual a 50% (1). Atualmente, a ICFEP tem apresentado uma incidência crescente (correspondendo a cerca de 50% da IC) e uma taxa de mortalidade constante (2).

Na ICFEP, o principal mecanismo fisiopatológico subjacente é a disfunção diastólica (DD) (3). Contudo, a presença de DD não poderá ser utilizado como critério diagnóstico isolado desta entidade de IC, podendo estar presente na ICFER ou mesmo em indivíduos assintomáticos (4). A DD encontra-se frequentemente associada a fatores de risco importantes como a idade, hipertensão arterial e hipertrofia do VE (5). Apesar dos fatores de risco serem semelhantes aos da ICFER, os mecanismos fisiopatológicos divergem (4).

Desta forma, verifica-se a relevância do estudo dos mecanismos fisiopatológicos associados à ICFEP bem como de potenciais formas de tratamento direcionado.

OBJETIVOS

Assim, esta revisão visa sumariar os mecanismos conhecidos e a investigação que tem sido feita no sentido de os modular, sugerindo potenciais novas abordagens à DD.

DESENVOLVIMENTO

Fisiopatologia

Na DD, a manutenção da fração de ejeção (FE) deve-se ao aumento de pressões de enchimento ventricular (6), o que poderá estar presente numa fase latente, em que o enchimento diastólico se encontra alterado, mas associado a uma

tolerância ao exercício normal. No entanto, esta capacidade ao exercício diminuirá com a progressão da IC, uma vez que se torna impossível aumentar o volume tele-diastólico necessário à ejeção face à rigidez ventricular e interferência com o relaxamento cardíaco (7).

Deste modo, verifica-se um aumento do índice entre a massa e o volume do ventrículo esquerdo, em que o relaxamento ventricular ocorre lentamente na fase inicial da diástole, oferecendo uma resistência ao enchimento na fase final, subjacente ao aumento das pressões diastólicas. Na sequência destas alterações fisiopatológicas surgem os sinais e sintomas associados, nomeadamente o aparecimento de dispneia e hipertensão pulmonar ⁽⁴⁾. Adicionalmente, o volume tele-diastólico tenderá a diminuir (apesar da manutenção da FE), contribuindo igualmente para a diminuição do débito cardíaco (8).

O aparecimento da DD encontra-se associada frequentemente à presença de hipertensão arterial. A disfunção vascular, subjacente ao fator de risco cardiovascular enunciado anteriormente, promove uma sobrecarga de pressão do VE e, conseqüentemente, uma remodelagem ventricular esquerda caracterizada por uma hipertrofia concêntrica, presença de fibrose e DD. Estas alterações provocam alterações graduais a montante, através de uma inicial hipertensão e remodelagem auricular esquerda, seguindo-se uma hipertensão venosa pulmonar e conseqüentemente uma remodelagem das câmaras cardíacas direitas. Adicionalmente, uma variedade de diferentes fatores sistêmicos encontra-se na origem da DD, através de um conjunto de fatores pro-inflamatórios (nomeadamente hipertensão arterial, diabetes mellitus, síndrome metabólico) que, através da inflamação sistémica microvascular endotelial e *stress* oxidativo, estão na base da remodelagem e disfunção cardíacas (3).

Subjacente ao efeito da inflamação sistémica microvascular, salienta-se o resultado do estudo de Hotta, K. *et al.*, em que o exercício físico mostrou reversão da disfunção microvascular e diastólica em ratazanas envelhecidas, através da função endotelial (9) concluindo-se que a atividade física representa um mecanismo importante na modulação da DD, mesmo quando iniciada em idade avançada.

Deste modo, observa-se que o *stress* oxidativo poderá estar associado à etiologia de DD, através da síntese de óxido nítrico (NOS) e formação de espécies reativas de oxigénio mitocondrial (4) (Figura 1).

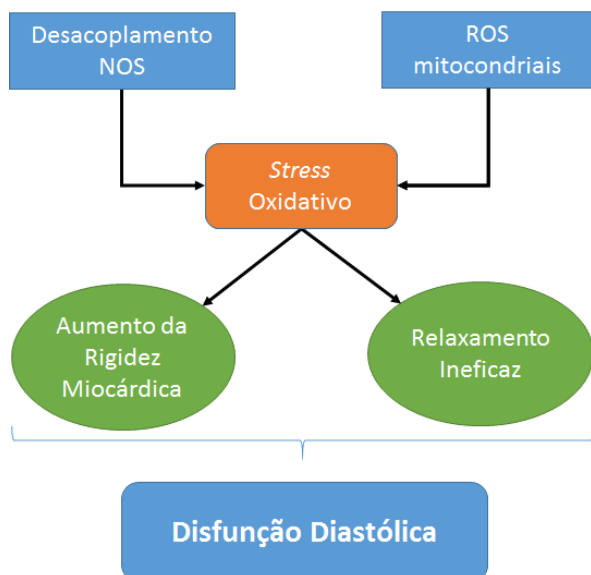


Figura 1. Representação esquemática do papel do *stress* oxidativo no desenvolvimento de DD.

O óxido nítrico (NO) é um modulador importante do relaxamento miocárdico sendo formado pela NOS em condições fisiológicas e quando na presença do cofator tetrahidrobioptireno (BH-4). No entanto, na presença de quantidades reduzidas de BH-4 (como no contexto de DD associada à hipertensão arterial), ocorre o **desacoplamento da NOS**, provocando um aumento de superóxido e diminuição de NO (10). Neste contexto salienta-se o estudo de Jeong, E.-M *et al.*, em que nos ratinhos com hipertensão arterial ligeira, *stress* oxidativo e DD, a administração de BH-4 melhora a função diastólica e os parâmetros de relaxamento (10). Os inibidores da redutase HMG-CoA também estão presentes no aumento da atividade da NOS (11), subjacente ao aumento da biodisponibilidade de BH-4 (4).

A **formação de espécies reativas de oxigénio mitocondriais** encontra-se também na etiologia do *stress* oxidativo, nomeadamente na diabetes mellitus (4, 12). A corroborar a afirmação anterior, o estudo de Umbarkar, P. *et al.* descreveu um aumento da atividade da monoaminase oxidase A, MAO-A (proteína mitocondrial produtora de peróxido de hidrogénio), em ratazanas com diabetes e cardiomiopatia hipertrófica, nas quais a inibição específica desta proteína com clorgilina preveniu a DD por redução do *stress* oxidativo, apoptose e fibrose miocárdica (13). Num outro estudo, em ratinhos submetidos a uma dieta com

elevado teor em gordura, a administração de mitoTEMPO (um antioxidante mitocondrial) diminuiu a formação de espécies reativas de oxigênio, prevenindo o desenvolvimento de DD (12). Estas formas descritas de modulação do *stress* oxidativo poderão contribuir para a formulação de novas potenciais abordagens no tratamento da DD.

É complexo identificar um mecanismo único responsável pela etiologia da DD, contudo poderemos, de uma forma simplista, dividir os mecanismos de DD em dois processos diferentes: uns que aumentam a rigidez passiva e outros que contribuem para o relaxamento miocárdico mais lento (6).

MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS – RIGIDEZ MIOCÁRDICA

A rigidez miocárdica enquadra-se num conjunto de propriedades passivas da parede ventricular, juntamente com a espessura e geometria das câmaras cardíacas (14).

Colagénio – Fibrose

O principal mecanismo subjacente à rigidez miocárdica é a fibrose, que depende da quantidade de colagénio da matriz miocárdica e da extensão das ligações cruzadas de colagénio (6).

Verifica-se um aumento do conteúdo de fibrose nos contextos pró-inflamatórios, associado à subida dos níveis de *stress* oxidativo (4). A regulação do conteúdo de colagénio é realizada através da sua expressão genética bem como do balanço entre a atividade das metaloproteínases da matriz e dos seus inibidores tecidulares (6).

Por consequência se constata que inúmeras proteínas envolvidas na regulação do colagénio podem constituir potenciais biomarcadores, tal como o pro-péptido terminal-carboxilo procologénio tipo 1 (que é libertado no plasma e que permite estimar a taxa de síntese de colagénio cardíaco) (15).

Adicionalmente, as pontes cruzadas de colagénio apresentam um importante efeito no aumento das pressões de enchimento em doentes com IC (estadio C),

estando relacionadas com a DD e DS nesses doentes (16). As ligações entre fibrilas de colagénio formam partículas insolúveis mais resistentes às metaloproteínases (16). A lisil oxidase (16, 17), e a proteína transmembranar, sindecan-4 (18), são mediadoras da formação destas pontes cruzadas de colagénio, podendo por tal facto serem referenciados como potenciais alvos de estudo de modo a aferir a sua importância na modulação da DD.

Isoformas da Titina/Alterações pós-translacionais de Titina

A titina é uma macromolécula do sarcómero, que estabiliza e ancora os filamentos espessos aos discos Z (6, 19). Esta macromolécula possui duas isoformas: a mais rígida, N2B, e a mais distensível, N2BA (4, 19), cuja razão entre elas é aproximadamente 65:35 (6).

No contexto de ICFEP, a isoforma N2BA encontra-se aumentada, o que poderá ser interpretado como um mecanismo compensatório e não causal de DD, face à rigidez ventricular esquerda presente.

A importância do tamanho/complacência da titina encontra-se também descrita no estudo de Methawasin, M. *et al.*, em que os ratinhos apresentavam DD e uma diminuição da atividade do fator de *splicing* de RNA da titina pela inibição da RBM20 (20). Estes expressaram isoformas da titina com elevado grau de complacência, estando associadas a uma diminuição da rigidez miocárdica e melhoria à tolerância ao exercício. Deste modo, a inativação da RBM20 poderá ser um potencial alvo terapêutico.

A estrutura molecular da titina pode ainda ser alterada ao nível pós-translacional por vários mecanismos, nomeadamente pela fosforilação e pela nitrosilação (4, 19, 21). A fosforilação do segmento N2Bus da titina ocorre através da ação da PKA, da PKG e da ERK-2, estando associada à diminuição da tensão de repouso. Por outro lado, a administração de PKC-alfa promove um aumento da fosforilação no segmento PEVK da titina, promovendo um aumento da sua rigidez passiva (6, 22). Estas vias de modulação poderão também constituir potenciais alvos terapêuticos como, por exemplo, os inibidores da fosfodiesterase 5A, nomeadamente sildenafil, que aumenta a atividade da PKG miocárdica. No entanto, o estudo de Redfield M. M. *et al.* não revelou melhorias

clínicas nem na capacidade de exercício, qualidade de vida, remodelagem do VE, parâmetros da função diastólica ou pressão sistólica da artéria pulmonar em doentes com ICDEF tratados com sildenafil (23). No estudo de Hamdani N. *et al.* revelou que, em ratinhos diabéticos, a inibição da diptidilpeptidase-4 com sitagliptina diminuiu a rigidez ventricular, relacionando-se com o aumento da atividade de cGMP e PKG e, consequentemente, com a fosforilação da titina (24).

MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS – RELAXAMENTO MIOCÁRDICO

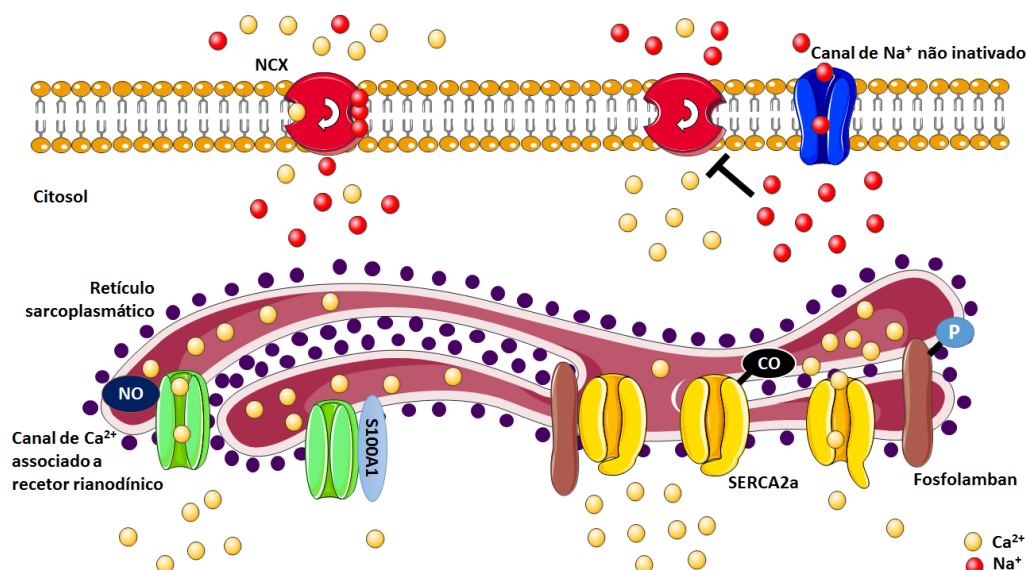
O relaxamento miocárdico depende de três fatores: carga, inativação e não-uniformidade (14). Assim, o enchimento ventricular (pré-carga) permite aos miofilamentos previamente inativados (por mecanismos relacionados com a homeostasia do cálcio e da cinética das pontes cruzadas) recuperarem as posições originais de repouso, sendo necessária também uma sincronização temporal entre estes dois processos (14).

Homeostasia do cálcio

A elevação transitória da concentração de cálcio despoletada pela excitação celular, permite a formação de pontes-cruzadas entre os filamentos de actina e de miosina pela ligação do cálcio à troponina C. Enquanto os níveis de cálcio estiverem elevados, a troponina C continua ativada e mantém a formação de ciclos de ligação entre os filamentos sarcoméricos (onde os filamentos de actina deslizam sobre os de miosina, levando à diminuição do comprimento do sarcómero), gerando-se tensão (25). Assim, no relaxamento miocárdico (e especificamente para a sua inativação) torna-se necessário a diminuição da concentração do cálcio citosólico e o desacoplamento destas ligações (14).

Um potencial mecanismo para a DD é a elevação dos níveis diastólicos de cálcio, provocando uma inativação deficiente ou incompleta (6, 25). Os canais e proteínas transportadoras que interferem na regulação do cálcio intracelular (Figura 2.) são: canal libertador de cálcio do retículo sarcoplasmático (recetor

rianodínico), bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), canal de Ca^{2+} do sarcolema tipo-L e o trocador Na^{+} - Ca^{2+} (NCX) (4, 25).



Inicialmente e durante despolarização, a elevação dos níveis de cálcio ocorre,

Figura 2. Representação sumária de alguns dos mecanismos responsáveis pela acumulação de cálcio (Ca^{2+}) diastólico: **nitrosilação (NO) do canal libertador de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (associado a recetor rianodínico)**, que promove o escape de Ca^{2+} para o citosol (enquanto S100A1 o diminui); **carbonilação (CO) de SERCA2a ou a sua ligação ao fosfolamban** que, ao inativarem este transportador, inibem a sua recaptação de Ca^{2+} durante a diástole (a fosforilação do fosfolamban permite o efeito oposto); e a **inativação deficiente dos canais de sódio (Na^{+})**, que aumenta a concentração de Na^{+} e, por isso, inibe a atividade do trocador Na^{+} - Ca^{2+} (NCX) e consequente extrusão de Ca^{2+} . Utilização do banco de imagens "Servier Medical Art" - <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>

pelos canais de cálcio tipo-L. Esta elevação transitória permite a ativação de canais de cálcio do retículo sarcoplasmático através da ativação do recetor rianodínico e, consequentemente, a contração muscular cardíaca (25). Alterações no recetor rianodínico (nomeadamente a sua nitrosilação por mecanismos que envolvem *stress* oxidativo) podem promover a libertação do cálcio do retículo sarcoplasmático para o citosol durante a diástole, contribuindo para a diminuição da velocidade de relaxamento e DD (4). A expressão da proteína de ligação ao cálcio S100A1 está diminuída na IC, e, a transferência génica codificadora desta proteína associa-se a diminuição do transporte do cálcio para o citosol por interação com o recetor rianodínico, melhorando quer a função contráctil quer o relaxamento em células cardíacas humanas isoladas (25). (Figura 2).

Após a elevação dos níveis do cálcio sarcoplasmático, os canais SERCA2a e NCX promovem a remoção do cálcio (4, 25, 26).

Deste modo, verifica-se que qualquer mecanismo que promova a atividade da SERCA2a evita, conseqüentemente a sobrecarga de Ca^{2+} , facilitando a inativação miocárdica. A atividade da SERCA2a é inibida pelo fosfolamban (Figura 2), cuja inativação é realizada através da fosforilação pela PKA, que por sua vez promove o aumento da atividade da SERCA2a. E, a PP1 (*Protein Phosphatase 1*) desfosforila o fosfolamban, obtendo-se o efeito oposto (25).

No entanto, na diabetes, a expressão de SERCA2a e fosfolamban (bem como a sua fosforilação) não aparenta exercer um importante impacto na sobrecarga de Ca^{2+} , especialmente na fase mais precoce da doença. Por exemplo, a carbonilação de certas porções de SERCA2a (metilglioxal >5 $\mu\text{mol/L}$ em ratas com diabetes mellitus tipo 1) reduz o transporte de cálcio, sendo que o tratamento com piridoxamina (a qual diminui os níveis de espécies reativas de carbonilo) mitigou a perda de atividade deste transportador (27). A modulação destes canais e proteínas reguladoras podem constituir igualmente objeto de estudos adicionais de modo a avaliar o seu potencial valor terapêutico.

Adicionalmente, a diminuição de expressão de SERCA2a pode ocorrer com a elevação dos níveis de TNF-alfa pela via de sinalização IKK/I κ B/NF-kB e pela ligação do NF-kB ao promotor genético do transportador de cálcio. Este efeito é bloqueado através da administração de sinvastatina, pela inibição seletiva de TNF-alfa (etanercept) e pela diminuição da expressão de NF-kB (N-acetilcisteína), resultando na atenuação da DD (28). Estes fármacos poderão ser avaliados em mais estudos tendo em vista o seu potencial efeito terapêutico na DD (nomeadamente as estatinas).

O NCX é um canal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ presente na membrana plasmática, cuja expressão está normalmente aumentada na IC, situação que constitui possivelmente um mecanismo compensatório (4, 25, 26). Na IC, a possível inativação deficiente dos canais de Na^+ aumenta a concentração de sódio na célula e, conseqüentemente, diminui a extrusão de cálcio pelo NCX (4, 29) (Figura 2). Os efeitos da elevação dos níveis de expressão deste canal (através, por exemplo, de um vetor vírico), na DD, permanecem controversos (25).

A ranolazina é um anti-anginoso com múltiplos mecanismos de ação. Este fármaco demonstrou ter capacidade para melhorar o relaxamento miocárdico e diminuir a DD cujo efeito está aparentemente relacionado com a diminuição da corrente tardia de sódio (I_{Na} - corrente presente na IC pela inativação deficiente dos canais de Na^+ , como já foi referido) e consequente diminuição dos níveis de cálcio diastólico (29). Da mesma forma, inibidores da I_{Na} podem potencialmente constituir uma terapêutica farmacológica de prevenção em doentes jovens com mutação de alto risco para cardiomiopatia hipertrófica (30).

Sensibilidade dos miofilamentos e cinética das pontes-cruzadas

Uma elevada concentração absoluta de cálcio diastólico pode ocorrer fisiologicamente, nomeadamente com o aumento da frequência cardíaca, que no ser humano se acompanha com aumento da força gerada. Esta concentração pode inclusivamente ser superior do que a observada durante a sístole aquando de um estímulo de intensidade inferior. Desta forma, o relaxamento miocárdico encontra-se subjacente à diminuição da sensibilidade das proteínas ao cálcio intracelular. Na DD, a diminuição da sensibilidade compensatória à elevação da frequência cardíaca encontra-se inibida, uma vez que qualquer aumento da concentração de cálcio acarreta diminuição da velocidade de relaxamento (8). Neste contexto, um tamponamento de cálcio poderia aumentar a rapidez com que este é removido dos miofilamentos, ficando estes inativados mais prematuramente, por exemplo através da ação da parvalbumina. A parvalbumina encontra-se acoplada com iões de magnésio, durante o relaxamento; e, aquando da contração muscular, a elevação da concentração de cálcio permite a troca de Mg^{2+} por Ca^{2+} , facilitando o relaxamento. No entanto, é necessário um determinado período de tempo para que esta troca ocorra, havendo o risco de o cálcio ser imediatamente tamponado e não permitir uma contração muscular eficaz (25). Assim, novas investigações poderão ser orientadas para os fatores envolvidos na ligação de cálcio ao tampão, bem como o momento em que o cálcio atinge o máximo de capacidade de tamponamento durante o ciclo cardíaco, de forma a melhorar a função diastólica sem comprometer a função sistólica.

A variação da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio é, também, um importante fator para a contratilidade e relaxamento cardíacos, que se ajusta de forma inversa, em situações fisiológicas, à sua concentração intracelular. No entanto, por exemplo, no trabalho de Varian, K. D. *et al.*, em coelhos com hipertrofia ventricular direita secundária constrição da artéria pulmonar, o aumento da frequência cardíaca não é acompanhado com a diminuição compensatória da sensibilidade ao cálcio, contribuindo para um relaxamento miocárdico deficiente (31).

De facto, são inúmeros os mecanismos de regulação da sensibilidade ao cálcio, nomeadamente, a alterações pós-translacionais da troponina I, da cadeia leve de miosina 2 e da proteína de ligação à miosina C (8, 32, 33).

A CaMKII (Ca^{2+} /calmodulin (Ca/CaM)-dependent protein kinase) está envolvida na fosforilação de inúmeras proteínas durante todo o ciclo cardíaco, modelando quer a concentração de cálcio intracelular, quer a sensibilidade dos miofilamentos. A troponina I é uma das proteínas fosforiladas por este agente (especialmente com o aumento da frequência cardíaca), diminuindo, assim, a sua sensibilidade ao cálcio e, consequentemente, facilitando o relaxamento miocárdico. Deste modo, apesar da inibição desta cínase estar associada a melhor contratilidade cardíaca, esta poderá provocar DD (32). Também, a troponina I pode ser fosforilada por inúmeras cínases, como, por exemplo, a PKA pela estimulação beta-adrenérgica, embora esta aconteça noutro local específico da proteína (8, 32).

Assim, a investigação sobre os potenciais agentes dessensibilizadores da troponina I poderá ser importante uma vez que este mecanismo constitui uma potencial abordagem na modulação da função diastólica. No estudo de Alves, M. L. *et al.*, em ratinhos com alfa-tropomiosina mutada (e, por consequência, sensibilidade ao cálcio mais elevada), aqueles que também expressavam pseudo-fosforilação da troponina I não sofreram remodelagem (hipertrofia miocárdica) e DD (34). Tal resultado poderá indicar uma possível utilidade de dessensibilizadores de cálcio no tratamento de síndromes de cardiomiopatia hipertrófica por mutação de miofilamentos finos. Adicionalmente, no estudo de Zhang, L. *et al.*, em ratinhos com troponina I mutada (e com sensibilidade

aumentada), o tratamento com epigallocatequina-3-galato (um extrato de chá verde) preveniu a formação de cardiomiopatia restritiva e melhorou a função diastólica por diminuição dos níveis de sensibilidade da troponina C ao cálcio intracelular (35).

A proteína de ligação à miosina C está, também, relacionada com a cinética das ponte-cruzadas aos miofilamentos, cujas alterações pós-translacionais nesta proteína parecem modular a função sistólica bem como a diastólica (10, 33, 36, 37). Uma destas alterações corresponde à sua fosforilação, cujo efeito melhora a função diastólica, aparentemente, por facilitar o desacoplamento das miofibrilas, sem prejuízo na formação das pontes-cruzadas (36). Por outro lado, a glutathionilação da proteína de ligação à miosina C contribui para o desenvolvimento de DD, encontrando-se relacionada com o *stress* oxidativo secundário à hipertensão arterial (10, 33, 36, 37). De facto, a oxidação através da glutathiona aumenta a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio e deprime a cinética das pontes-cruzadas (33, 37). Desta forma, a administração oral de BH-4 (cofator da NOS), que revelou efeitos positivos na função diastólica em ratinhos com *stress* oxidativo no estudo já referenciado, parece atuar mais especificamente na diminuição dos níveis elevados de glutathionilação da proteína de ligação à miosina C (10). Para além disso, a ranolazina demonstrou melhorar a DD em ratinhos hipertensivos, através do mecanismo também envolvido na diminuição deste tipo específico de alteração pós-translacional (33). Assim, os efeitos destas alterações poderão ser mais profundamente estudados de forma a avaliar o seu potencial efeito terapêutico em doentes com DD, através da modulação da cinética de pontes-cruzadas dos miofilamentos e da sensibilidade ao cálcio, com o objetivo de obter uma inativação destas ligações mais eficaz e um efeito globalmente positivo no relaxamento miocárdico.

CONCLUSÕES

Os mecanismos fisiopatológicos da DD têm sido objeto de ampla investigação. No entanto, os estudos realizados, nomeadamente ensaios clínicos, não encontraram, ainda, terapêuticas eficazes e direcionadas para a ICfEP. Assim, no presente estudo procuramos rever potenciais alvos terapêuticos, que possam ser testados, futuramente, no contexto desta patologia.

Os mecanismos subjacentes a estes potenciais alvos terapêuticos poderão ser: mecanismos que contrariem a inflamação/disfunção microvascular (como o exercício físico) e *stress* oxidativo (nomeadamente o papel do BH-4 e do antioxidante mitocondrial mitoTEMPO); a formação de compostos insolúveis de colagénio (mediada pela lisil oxidase e sindecán-4); processos de modulação da complacência da titina, nomeadamente ao nível de alterações pós-translacionais (potenciais terapêuticos do sildenafil e da sitagliptina).

Ao nível do relaxamento miocárdico novas abordagens terapêuticas podem ser encontradas nos estudos relativos aos níveis de expressão e de atividade das proteínas que participam na modulação das concentrações de cálcio durante o ciclo cardíaco nomeadamente: a diminuição da carbonilação de SERCA2a pela piridoxamina; a inibição da expressão deste transportador pelo TNF-alfa e o bloqueio desta via de sinalização (IKK/IkB/NF-kB) com as estatinas, etarcept ou *N*-acetilcisteína; o papel da ranolazina na depressão dos níveis de cálcio diastólico. Por outro lado, a cinética das pontes-cruzadas e a sensibilidade ao cálcio dos miofilamentos constituem potenciais alvos terapêuticos como, por exemplo, dessensibilizadores de cálcio (como a epigallocatequina-3-galato) e alterações pós-translacionais da proteína de ligação à miosina C (nomeadamente o papel do *stress* oxidativo e da ranolazina na sua glutatilonilação).

AGRADECIMENTOS

Deixo os meus agradecimentos ao Prof. Adelino Leite Moreira por toda a disponibilidade que mostrou e também ao Prof. Ricardo Fontes Carvalho pela orientação prestada. Um agradecimento também à Dra. Ana Filipa Ferreira e à Dra. Francisca Saraiva pelo esclarecimento de dúvidas e revisão crítica do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failureThe Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC)Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. European Heart Journal. 2016;37(27):2129-200.
2. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. The New England journal of medicine. 2006;355(3):251-9.
3. Redfield MM. Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. New England Journal of Medicine. 2016;375(19):1868-77.
4. Jeong E-M, Dudley SC. Diastolic Dysfunction: Potential New Diagnostics and Therapies. Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society. 2015;79(3):470-7.
5. Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett, Jr JC, Mahoney DW, Bailey KR, et al. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: Appreciating the scope of the heart failure epidemic. JAMA. 2003;289(2):194-202.
6. Campbell KS, Sorrell VL. Cell- and molecular-level mechanisms contributing to diastolic dysfunction in HFpEF. Journal of Applied Physiology. 2015;119(10):1228-32.
7. Aziz F, Tk L-A, Enweluzo C, Dutta S, Zaeem M. Diastolic Heart Failure: A Concise Review. Journal of Clinical Medicine Research. 2013;5(5):327-34.
8. Janssen PML. Myocardial contraction-relaxation coupling. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. 2010;299(6):H1741-H9.
9. Hotta K, Chen B, Behnke BJ, Ghosh P, Stabley JN, Bramey JA, et al. Exercise training reverses age-induced diastolic dysfunction and restores coronary microvascular function. The Journal of Physiology. 2017:n/a-n/a.

10. Jeong E-M, Monasky MM, Gu L, Taglieri DM, Patel BG, Liu H, et al. Tetrahydrobiopterin improves diastolic dysfunction by reversing changes in myofilament properties. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2013;56:44-54.
11. Biria M, Howard PA, Vacek J. Do statins have a role in the management of diastolic dysfunction? *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions*. 2008;8(5):297-303.
12. Jeong EM, Chung J, Liu H, Go Y, Gladstein S, Farzaneh-Far A, et al. Role of Mitochondrial Oxidative Stress in Glucose Tolerance, Insulin Resistance, and Cardiac Diastolic Dysfunction. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*. 2016;5(5):e003046.
13. Umbarkar P, Singh S, Arkat S, Bodhankar SL, Lohidasan S, Sitasawad SL. Monoamine oxidase-A is an important source of oxidative stress and promotes cardiac dysfunction, apoptosis, and fibrosis in diabetic cardiomyopathy. *Free radical biology & medicine*. 2015;87:263-73.
14. Leite-Moreira AF. Current perspectives in diastolic dysfunction and diastolic heart failure. *Heart*. 2006;92(5):712-8.
15. Querejeta R, Varo N, López B, Larman M, Artíñano E, Etayo JC, et al. Serum Carboxy-Terminal Propeptide of Procollagen Type I Is a Marker of Myocardial Fibrosis in Hypertensive Heart Disease. *Circulation*. 2000;101(14):1729.
16. Lopez B, Querejeta R, Gonzalez A, Larman M, Diez J. Collagen cross-linking but not collagen amount associates with elevated filling pressures in hypertensive patients with stage C heart failure: potential role of lysyl oxidase. *Hypertension*. 2012;60(3):677-83.
17. Voorhees AP, DeLeon-Pennell KY, Ma Y, Halade GV, Yabluchanskiy A, Iyer RP, et al. Building a better infarct: Modulation of collagen cross-linking to increase infarct stiffness and reduce left ventricular dilation post-myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;85:229-39.
18. Herum KM, Lunde IG, Skrbic B, Louch WE, Hasic A, Boye S, et al. Syndecan-4 is a key determinant of collagen cross-linking and passive

myocardial stiffness in the pressure-overloaded heart. *Cardiovascular research*. 2015;106(2):217-26.

19. Castro-Ferreira R, Fontes-Carvalho R, Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF. Papel da titina na modulação da função cardíaca e suas implicações fisiopatológicas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2011;96:332-9.

20. Methawasini M, Strom JG, Slater RE, Fernandez V, Saripalli C, Granzier H. Experimentally Increasing the Compliance of Titin Through RNA Binding Motif-20 (RBM20) Inhibition Improves Diastolic Function In a Mouse Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation*. 2016;134(15):1085-99.

21. Figueiredo-Freitas C, Dulce RA, Foster MW, Liang J, Yamashita AMS, Lima-Rosa FL, et al. S-Nitrosylation of Sarcomeric Proteins Depresses Myofilament Ca(2+) Sensitivity in Intact Cardiomyocytes. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2015;23(13):1017-34.

22. Hamdani N, Franssen C, Lourenco A, Falcao-Pires I, Fontoura D, Leite S, et al. Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model. *Circulation Heart failure*. 2013;6(6):1239-49.

23. Network AscbtHFCR, Redfield MM, Chen HH, Borlaug BA, Semigran MJ, Lee KL, et al. Effect of Phosphodiesterase-5 Inhibition on Exercise Capacity and Clinical Status in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: A Randomized Clinical Trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2013;309(12):10.1001/jama.2013.24.

24. Hamdani N, Hervent AS, Vandekerckhove L, Matheeußen V, Demolder M, Baerts L, et al. Left ventricular diastolic dysfunction and myocardial stiffness in diabetic mice is attenuated by inhibition of dipeptidyl peptidase 4. *Cardiovascular research*. 2014;104(3):423-31.

25. Asp ML, Martindale JJ, Heinis FI, Wang W, Metzger JM. Calcium mishandling in diastolic dysfunction: mechanisms and potential therapies. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833(4):895-900.

26. Val-Blasco A, Piedras MJ, Ruiz-Hurtado G, Suarez N, Prieto P, Gonzalez-Ramos S, et al. Role of NOD1 in Heart Failure Progression via Regulation of

Ca²⁺ Handling. *Journal of the American College of Cardiology*. 2017;69(4):423-33.

27. Shao CH, Capek HL, Patel KP, Wang M, Tang K, DeSouza C, et al. Carbonylation Contributes to SERCA2a Activity Loss and Diastolic Dysfunction in a Rat Model of Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2011;60(3):947-59.

28. Tsai CT, Wu CK, Lee JK, Chang SN, Kuo YM, Wang YC, et al. TNF- α down-regulates sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase expression and leads to left ventricular diastolic dysfunction through binding of NF- κ B to promoter response element. *Cardiovascular research*. 2015;105(3):318-29.

29. Williams S, Pourrier M, McAfee D, Lin S, Fedida D. Ranolazine improves diastolic function in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2014;306(6):H867-H81.

30. Coppini R, Mazzoni L, Ferrantini C, Gentile F, Pioner JM, Laurino T, et al. Ranolazine Prevents Phenotype Development in a Mouse Model of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation Heart failure*. 2017;10(3).

31. Varian KD, Kijawornrat A, Gupta SC, Torres CAA, Monasky MM, Hiranandani N, et al. Impairment of Diastolic Function by Lack of Frequency-Dependent Myofilament Desensitization in Rabbit Right Ventricular Hypertrophy. *Circulation Heart failure*. 2009;2(5):472-81.

32. Guilbert A, Lim HJ, Cheng J, Wang Y. CaMKII-dependent myofilament Ca(2+) desensitization contributes to the frequency-dependent acceleration of relaxation. *Cell calcium*. 2015;58(5):489-99.

33. Lovelock JD, Monasky MM, Jeong E-M, Lardin HA, Liu H, Patel BG, et al. Ranolazine improves cardiac diastolic dysfunction through modulation of myofilament calcium sensitivity. *Circulation Research*. 2012;110(6):841-50.

34. Alves ML, Dias FAL, Gaffin RD, Simon JN, Montminy EM, Biesiadecki BJ, et al. Desensitization of Myofilaments to Ca(2+) as a Therapeutic Target for Hypertrophic Cardiomyopathy with Mutations in Thin Filament Proteins. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2014;7(2):132-43.

35. Zhang L, Nan C, Chen Y, Tian J, Jean-Charles PY, Getfield C, et al. Calcium desensitizer catechin reverses diastolic dysfunction in mice with

restrictive cardiomyopathy. Archives of biochemistry and biophysics. 2015;573:69-76.

36. Tong CW, Nair NA, Doersch KM, Liu Y, Rosas PC. Cardiac myosin-binding protein-C is a critical mediator of diastolic function. Pflugers Archiv. 2014;466(3):451-7.

37. Patel BG, Wilder T, Solaro RJ. Novel control of cardiac myofilament response to calcium by S-glutathionylation at specific sites of myosin binding protein C. Frontiers in physiology. 2013;4:336.



1. Normas de publicação

1.1 Autores

Todos os indivíduos listados como autores deverão ter participado no processo de conceção/realização do artigo e deverão cumprir as seguintes condições:

- 1) Ter contribuído substancialmente no trabalho;
- 2) Ter revisto o manuscrito em todo o seu conteúdo e concordarem com a publicação final do mesmo;
- 3) Ser capaz de discutir publicamente e defender o conteúdo do manuscrito;
- 4) Todos os autores do trabalho deverão ser identificados com nome, filiação e endereço eletrónico.

Autoria: os autores devem assumir a responsabilidade de pelo menos uma das componentes do manuscrito, ser capaz de identificar os outros responsáveis e estar confiante na integridade de seus coautores.

A autoria não se baseia na obtenção de financiamento, na disponibilização de conselhos, ou similar. As pessoas que contribuem como tal podem ser mencionadas nos agradecimentos.

Os indivíduos que disponibilizaram contributos retribuídos financeiramente (inclui escritores médicos, estatísticos, epidemiologistas e quaisquer outros envolvidos com a gestão e análise de dados) podem satisfazer os critérios de autoria. Se não o fizerem, eles devem ser listados na secção de agradecimentos.

A Cardiopulmonar não irá considerar as submissões que são escritas por funcionários da indústria ou escritores contratados, bem como estudos patrocinados pela indústria em que os dados foram recolhidos e analisados



apenas por funcionários da empresa. Tais estudos serão considerados somente se houver uma análise independente da metodologia e dados por indivíduos que façam parte de uma instituição académica, com experiência na investigação e publicação (por exemplo, Escolas Superiores de Saúde, Faculdade de Medicina, Institutos de Investigação ou fundações de domínio público com o esse objetivo).

Autor responsável: deverá existir um autor responsável, o qual terá de enviar os seus dados pessoais (nome, sobrenome, graus académicos, filiação institucional e localização, laboratório, serviço, hospital, universidade, cidade, país) para o qual serão enviadas todas as notificações.

Juntamente com o artigo deverão ser enviados:

- a) Carta de apresentação (Anexo 1).
- b) Declaração de originalidade e cedência de direitos assinada, no mínimo, pelo autor principal (Anexo 2).

Conflito de interesses: A comunicação deve ser feita no momento da submissão e deve ser indicada na página de título do manuscrito. O grupo editorial irá decidir se a presença de conflitos de interesse afeta a adequação do manuscrito para publicação.

A política de conflito de interesses da Cardiopulmonar baseia-se na seguinte interpretação: Um conflito de interesses pode existir quando um autor (ou a instituição do autor, empregador ou membro da família) tem relações financeiras ou pessoais que possam influenciar ou criar um viés às decisões do autor, do seu trabalho, ou manuscrito. Todos os autores devem divulgar todos os potenciais conflitos de interesse, incluindo interesses financeiros específicos, relacionamentos e afiliações. As divulgações de potenciais conflitos de interesse devem ser para um período até 2 anos antes da submissão. Os autores devem assegurar totalmente a divulgação de todos os



potenciais conflitos de interesse relacionados com o conteúdo do manuscrito. O tipo de relação (por exemplo, consultor, palestrante, colaborador) e valor monetário (não precisa ser especificado). Se não existirem potenciais conflitos financeiros ou outros de interesse, uma declaração para este efeito deve ser incluída na página de título do manuscrito.

Para tal, todos os autores deverão enviar um documento formal aquando da submissão, remetendo qualquer possível conflito de interesse que poderá constituir um embaraço após a publicação, tais como:

- Ser colaborador de uma empresa que projeta, fabrica ou vende dispositivos médicos de saúde;
- Colaborar com um conselho consultivo ou como um consultor para uma empresa da área dos dispositivos médicos;
- Tendo recebido uma bolsa de investigação ou outra ajuda financeira do mesmo tipo de empresas;
- Ter recebido honorários para palestras, escrever ou outras atividades educacionais de determinada empresa da área de intervenção dos temas da revista;
- Ser titular de uma patente ou ter interesse financeiro (ações, obrigações, etc.) em produtos médicos;
- Ter sido apoiado com material para a investigação, incluindo subsídios, doação de equipamentos e consumíveis, e outras contribuições pagas para esse efeito.

Estes exemplos são destinados a ilustrar os diversos tipos de relações que podem constituir conflitos de interesse no campo científico da Cardiopulmonar, e não se destinam a ser exemplos rígidos.

A divulgação destas relações não afetará necessariamente a decisão de publicação do manuscrito. Possuir tais relações não é considerado antiético. No entanto, não divulgar as mesmas é antiético.



Esta política de conflito de interesse também se aplica aos Editores e Conselho Científico.

Relações com a indústria:

A Cardiopulmonar requer aos autores indicar o papel do financiamento de organizações ou patrocinadores na conceção do estudo, recolha, análise e interpretação dos dados. Os autores devem também divulgar o papel das organizações na elaboração, revisão e aprovação do manuscrito. A divulgação completa do papel das organizações que financiam deve ser incluída no início da secção da Metodologia.

Ética:

Estudos que envolvam indivíduos necessitam do parecer de uma Comissão de ética. Nestes casos, os autores deverão enviar em documento anexo a aprovação da referente investigação por uma Comissão de ética.

Os utentes deverão assinar o consentimento informado, o qual quando utilizado, e sob a forma de documento tipo, deverá igualmente constar em documento anexo.

Todas as investigações deverão estar conforme a Declaração de Helsínquia.

Em todos os casos que se verifiquem experiências animais, sugerimos aos autores que sigam as linhas de orientação ARRIVE aquando da preparação do manuscrito.

1.2 Preparação do Manuscrito

Os artigos candidatos a publicação deverão ser inéditos, e não deverão ter sido objeto de outro tipo de publicação.

O manuscrito deve ser redigido em documento Word, a preto e branco, com margens de 3 cm em todos os lados do documento e numeradas com



algarismos arábicos no canto inferior direito. O texto deve ser redigido em letra tipo Arial, tamanho 12 e parágrafo com espaçamento 1,5 linhas, justificado. Os títulos das secções devem ser em maiúsculas, centrados e separados do texto por 2 entes. A língua utilizada na redação do manuscrito poderá ser Portuguesa ou Inglesa.

Manuscritos enviados em formato PDF não serão aceites.

O manuscrito deverá conter Página de Título, estrutura de acordo com a tipologia do artigo submetido e Referências bibliográficas. Se adequado poderá incluir agradecimentos, imagens e anexos.

Na página de título deverá constar:

- a) Título - sem abreviaturas;
- b) Nome e apelido de cada autor e filiação institucional;
- c) Nome, correio eletrónico e contacto telefónico do autor responsável.

A página de título deverá ser o único local do documento onde constam os nomes dos autores.

Resumo: É obrigatório um resumo conciso e factual. Deverá apresentar no máximo 250 palavras. Deve descrever de forma breve o objetivo do trabalho bem como os principais resultados e conclusões. Deve seguir a seguinte estrutura:

- Artigos Originais ou de Revisão: (1) Introdução e Objetivos; (2) Metodologia; (3) Resultados/Desenvolvimento (4) Conclusão (5) Palavras-chave.
- Caso Clínico: (1) Introdução; (2) Descrição do caso; (3) Conclusão (4) Palavras-chave.



1.3 Tipologias de Artigos publicados na Cardiopulmonar

Os artigos publicados incluem artigos de investigação original, de revisão da literatura, de apresentação de caso clínico, casos de imagem e artigos de opinião. Em particular, no caso dos últimos, a sua submissão não é possível uma vez que serão redigidos através de convites endossados pelo Grupo Editorial.

Artigos de investigação originais

- Limite de 5000 palavras (incluindo legendas e títulos de imagens ou tabelas e referências bibliográficas).
- Deve apresentar a seguinte estrutura: introdução, objetivos, metodologia, resultados, discussão e conclusões;

Artigos de revisão

- Limite de 5000 palavras (incluindo legendas, títulos de imagens ou tabelas e referências bibliográficas).
- Deve apresentar a seguinte estrutura: introdução, objetivos, metodologia, desenvolvimento e conclusões;

Apresentação de caso clínico

- Limite de 3000 palavras (incluindo legendas, títulos de imagens ou tabelas e referências bibliográficas).
- Deve apresentar a seguinte estrutura: introdução, caso clínico e conclusões.

Casos de imagem



- Limite de 300 palavras (incluindo legendas e títulos de imagens ou tabelas).
- Terá de conter palavras-chave: mínimo de 3 máximo de 6 palavras.

Artigo de Opinião

- Limite de 2500 palavras.
- Terá de conter palavras-chave: mínimo de 3 máximo de 6 palavras.

1.4 Agradecimentos

Poderão ser referenciados nos agradecimentos todos os indivíduos que contribuíram para a investigação, mas que contudo não são autores do mesmo. O seu contributo deverá ser especificado, por exemplo, “efetuou recolha de dados”, “efetuou a revisão ortográfica do manuscrito”.

1.5 Referências Bibliográficas

A listagem das referências deve ser apresentada em página separada do texto, por quebra de página. Deverão ser identificadas no texto por números arábicos e descritas no final do artigo segundo o estilo Vancouver.

Comunicações pessoais, manuscritos em preparação e outros dados não publicados devem ser citados no texto entre parenteses e não nas referências bibliográficas. Os autores devem obter permissão da fonte da citação. Serão publicadas um máximo de 30 referências por artigo.



1.6 Imagens

Os quadros, tabelas, gráficos e figuras devem ser indicadas na sua posição pretendida ao longo do manuscrito, sendo remetidas em documento anexo. Não devem duplicar informação contida no texto. As imagens devem estar em formato JPEG.

Cada quadro, tabelas e figuras incluído nos artigos conta como 30 palavras.

As tabelas e quadros devem ter título breve e localizado superiormente e as figuras e gráficos devem ter legenda localizada inferiormente. Deve ser possível analisar as tabelas e imagens isoladamente do texto.

1.7 Anexos

Qualquer documentação que os autores considerarem pertinente incluir no artigo deverá ser enviada como documento anexo. Se necessário a referência ao anexo poderá estar descrita no texto.

1.8 Unidades de medida

As medidas devem ser expressas em unidades do sistema métrico (metro, quilograma ou litro) ou seus múltiplos decimais. Todos os valores hematológicos e de química clínica devem ser apresentados em unidades do sistema métrico, nos termos do Sistema Internacional de Unidades (SI).



1.9 Abreviaturas e símbolos

Devem ser utilizadas apenas abreviaturas padronizadas. A designação completa à qual se refere uma abreviatura deve preceder a primeira indicação desta no texto, a não ser que se trate de uma unidade de medida padrão.